

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

*Тихонова Л.В., Зубарева И.В.*

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов  
медицинский университет»*

Миллиарды клеток растущего организма (человека или животного) происходят всего-навсего из одной клетки - зиготы, которая образуется в результате слияния мужской и женской гамет. Эта единственная клетка содержит не только информацию об организме, но и схему ее последовательного развертывания. В ходе эмбриогенеза оплодотворенная яйцеклетка делится и дает начало клеткам, не имеющим других функций, кроме передачи генетического материала в следующие клеточные поколения. Это и есть стволовые клетки, геном которых находится в «нулевой точке»; механизмы, определяющие специализацию, еще не включены, из них потенциально могут развиваться любые клетки.

Термин «стволовая клетка» (СК) был введен в биологию А. А. Максимовым в 1908 году на съезде гематологического общества в Берлине. Однако на данном этапе не существует универсального определения термина «стволовая клетка». Очевидно, что общей характеристикой для всех СК, независимо от происхождения и источника выделения является то, что они обладают пятью общими свойствами [1, 6].

- 1) способность к самоподдержанию в течение длительного времени;
- 2) отсутствие каких-либо тканеспецифичных маркеров, ответственных за выполнение специальных функций;
- 3) способность к дифференцировке в любые специализированные клетки;
- 4) способность к асимметричному делению, т. е. из каждой стволовой клетки при митозе образуются две дочерние, одна из которых идентична родительской и остается стволовой, другая дифференцируется в специализированные клетки. Этот процесс нарушается с возрастом, у пожилых людей меньше СК, чем у детей и взрослых, но какое-то количество их сохраняется до глубокой старости;

5) способствуют регенерации благодаря миграции к зоне повреждения. Дифференциация клеток предполагает утрату способности к делению [5]. Высокодифференцированные клетки (кардиомиоциты, нейроны) не способны размножаться ни при каких обстоятельствах, в то время как менее дифференцированные клетки-фибробласты, гепатоциты частично сохраняют эту способность и при определенных условиях митотически увеличивают свое число. Общей закономерностью является то, что если клетка вышла на этап дифференцировки, то количество делений, которое она может пройти, ограничено (лимит Хейфлика). Это объясняется наличием концевых повторяющихся последовательностей ДНК хромосом (теломер), которые при воспроизведении генетического материала частично утрачиваются с каждым последующим делением. После того, как теломеры утрачены полностью, клетки оказываются неспособными к дальнейшему размножению (например, для фибробласта лимит Хейфлика составляет 50 делений, для стволовой клетки крови — 100). Описанное явление имеет большое биологическое значение: в случае, если произошла

поломка в геноме клетки, мутация будет растиражирована в ограниченном количестве и не сыграет большой роли для организма в целом

Стволовая клетка отличается от других клеток тем, что для нее лимит Хейфлика неисчерпаем (это обусловлено экспрессией фермента теломеразы, который после каждого деления «доставляет» теломеры), и клетка может делиться бесконечно — фактическое бессмертие (иммортальность)

Схематически, СК можно разделить на классы в зависимости от стадии развития человеческого организма, степени дифференциации и потенциала к гистогенезу [2, 4, 9]:

— *тотипотентные клетки*: первые восемь клеток зиготы, произведенные в результате первых трех делений, каждая из которых способна полностью развиться в человеческий организм. Это единственная клетка воспроизводит все органы эмбриона и необходимые для его развития структуры - плаценту и пуповину,;

— *плюрипотентные клетки*: в основном клетки эмбриобласта (пятье сутки), но также ранних стадий развития эмбриона и клетки пуповинной крови; способны дать начало более 200 клеточным типам трех основных зародышевых листков эмбриона — эктодерме, мезодерме и энтодерме и, в конце концов, - всем органам и тканям;

— *мультипотентные клетки*: клетки поздних стадий развития плода, тканей взрослого организма и пуповинной крови; способны дать начало специфическим клеточным типам, например, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга;

— *унипотентные клетки*: могут дифференцироваться только в единственный клеточный тип, например, овальные клетки печени, способные дифференцироваться только в гепатоциты;

— *специализированные клетки*: полностью функционально дифференцированные и достигшие зрелости клетки тканей взрослого организма.

ЭСК способны дифференцироваться в клетки многих типов (то есть являются плюрипотентными), в то время как региональные СК (РСК) дифференцируются в ограниченное число клеточных типов (т. е. мультипотентны или унипотентны). Доля стволовых клеток в тканях взрослого организма, как правило, очень мала. Например, кроветворные стволовые клетки (КСК) встречаются с частотой 1:10 000-15 000 клеток костного мозга или 1:100 000 клеток периферической крови. Перечень тканей, содержащих РСК, постоянно увеличивается и включает костный мозг, периферическую кровь, головной и спинной мозг, плаценту, дентальную пульпу, кровеносные сосуды, скелетные мышцы, эпителий кожи и пищеварительного тракта, роговлицу, печень, поджелудочную железу и др. [2]

У человека стволовые клетки идентифицированы:

— во внутреннем клеточном слое эмбриона на стадии бластоцисты — эмбриональные стволовые клетки (ЭСК),

— в некоторых тканях плода — фетальные стволовые клетки (ФСК),

— в пуповине, плаценте, а также в костном мозге — мезенхимальные стволовые клетки (МСК)

— и дифференцированных тканях — соматические стволовые клетки (ССК)

В некоторых органах СК, могут являться источником одного и более типов клеток (например СК нервной ткани может дифференцироваться в нейроны головного мозга, глиальные клетки и астроциты). Подобная трансформация СК называется «пластичностью» [7, 8].

Обнаружение и выделение СК происходит с помощью маркеров, которые, однако, найдены не ко всем видам СК. Эти поверхностные молекулы в различной степени ответственны за гетеро- и гомотипные взаимодействия между клеточными типами, а также служат рецепторами для факторов роста, цитокинов или межклеточного матрикса. Экспрессия этих молекул анализируется методом RT-PCR (обратная транскриптаза — полимеразная цепная реакция) мРНК и результаты подтверждаются проточной цитометрией

Существует серия поверхностных маркеров, характеризующих плюрипотентные ЭСК человека. К ним относятся ранние эмбриональные антигены SSEA-3 и SSEA-4. J. Weissman и соавт. [3] предложили набор сравнительных маркеров, экспрессирующих кроветворные стволовые клетки мыши и человека в недифференцированном состоянии: CD34, SCA-1/CD59, Thy1, CD38, C-kit+, Lin-, AC133. Маркером для нейрональных СК является белок промежуточных филаментов-нестин.

Многие классы поверхностных молекул мезенхимальных стволовых клеток человека известны, и можно привести их перечень:

*Специфические антигены*

SH2, SH3, SH4, STRO-1, гладкомышечный  $\alpha$ -актин, MAB1740, Thy-1;

*Цитокины и факторы роста*

интерлейкины 1 $\alpha$ , 6, 7, 8, 11, 12, 14 и 15, LIF, SCF, Flt-3-лиганд, GM-CSF, G-CSF, M-CSF;

*Рецепторы цитокиновые и факторов роста*

IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R; LIFR, SCFR, G-CSFR, IFN $\gamma$ R, TGF $\beta$ 1R, TGF $\beta$ 2R, TNF1R, TNF2R, bFGFR, PDGFR, EGFR;

*Молекулы адгезии*

ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, эндоглин, CD44 (рецептор к гиалуронану), интегрины  $\alpha$ V $\beta$ 3,  $\alpha$ V $\beta$ 5, интегриновые цепи  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ A,  $\alpha$ V,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4, LFA-3, L-селектин;

*Молекулы межклеточного матрикса*

коллагены I, III, IV, V и VI типов, фибронектин, ламинин, гиалуронан, протеогликаны

Отсутствие определенных поверхностных молекул также помогает охарактеризовать МСК человека. Известен факт отсутствия экспрессии в культурах разогнанных МСК человека гемопозитических маркеров CD14, CD34 и CD45, а также эндотелиальных маркеров — фактора фон Виллебранда и Р-селектина. И хотя никаких специфических поверхностных молекул не обнаружено, которые бы однозначно идентифицировали МСК человека, перечень поверхностных молекул дает ключ к пониманию сигналов и взаимодействий, которые могут стимулировать клеточный ответ и клеточную дифференциацию.

Чтобы проверить, являются ли клетки плюрипотентными, американские биологи [9] предложили два теста, давно апробированных на ЭСК животных. Таким образом, ученые надеются стандартизировать эксперименты, проводимые на ЭСК человека

Первый тест основан на введении предполагаемых ЭСК в организм каково-нибудь животного. Если у того образуется тератома (опухоль, содержащая клетки всех трех зародышевых листков), то плюрипотентность можно считать доказанной.

Второй тест заключается в маркировке клеток-кандидатов и введении их в развивающийся эмбрион. Если клетки оказываются во всех тканях родившегося детеныша, то они, скорее всего, плюрипотентны. Однако применение подобной методики может привести к появлению животного-химеры, во всех тканях которого присутствует человеческая ДНК, что с этической точки зрения неприемлемо.

Чтобы надежно идентифицировать истинно плюрипотентные клетки, необходимо выявить гены, способные включаться и выключаться в разное время в культивируемых ЭСК. Наличие такого профиля экспрессии генов не только стало бы инструментом для подтверждения способности клеток дать начало всем органам и тканям, но и позволило бы понять механизм самого феномена. К сожалению, профиль экспрессии генов ЭСК пока дает противоречивые результаты.

Литература:

1. Введение в молекулярную медицину (Под ред. Пальцева М. А.) – М., «Медицина» – 2004. – С. 319–337.
2. Вермель А. Е. Стволовые клетки: общая характеристика и перспективы применения в клинической практике // Клиническая медицина № 1, 2004 С. 5-11
3. Егоров В. В., Иванов А. А., Пальцев М. А. Стволовые клетки человека // Молекулярная медицина, 2003, 2 С. 3-14
4. Лишук В. А., Мосткова Е. В. Стволовые клетки: исследования и практика // Валеология, № 2, 2003 С. 4-16
5. Полищук Н., Бутенко Г. М. Эмбриональные стволовые клетки. начало великого пути // Медицинская газета «Здоровье Украины» № 12 2002
6. Смолянинов А. Б. Клеточная медицина: концепция ее развития // Клинич. патофизиол. – 2004. – № 1. – С. 10–18.
7. Смолянинов А. Б., Жаров Е. В., Козлов К. Л., Кириллов Д. А. Основы клеточной и генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний – Москва, 2005. – 192 с.
8. Almeida-Porada G., Porada C., Zanjani E. Adult stem cell plasticity and methods of detection // Rev. Clin. Exp. Hematol. – 2001 No 5 – P 26–41.
9. Majumdar M. K., Thiede M. A., Mosca J. D., Moorman M., and Gerson S. L. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived Mesenchymal stem cells and stromal cells // J. Cell. Physiol. - 1998 - Vol. 176. - P. 57-66